取扱説明書

Code No. KOD-201
Code No. KOD-201X5
Code No. KOD-201X10
保存温度　－２０℃

高正確性ＰＣＲ酵素

ＫＯＤ －Ｐｌｕｓ－

KOD -Plus- は、鹿児島県小宝島の硫気孔より単離された超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaranesis* KOD1 株由来の KOD DNA Polymerase[1,2] をベースに開発された高正確性 PCR 用酵素です。KOD DNA Polymerase の活性を抑える 2 種類のモノクローナル抗体が混合されており、Hot start 法を用いる特異性の高い PCR を行うことが可能です。

- KOD DNA Polymerase は、Polymerase 活性の他、強い 3´→5´Exonuclease 活性(Proofreading 活性)を持つため、高い正確性を示し、特にクローニングを目的とした PCR に適しています。
- 反応バッファー組成を至適化し、従来の KOD DNA Polymerase よりも伸長性と増幅効率を向上させています。また、この改良により、Taq DNA Polymerase の約 82 倍という非常に高い正確性を達成しています。
- 本酵素は、この KOD DNA Polymerase に 2 種類の抗 KOD モノクローナル抗体を加え、常温下において、Polymerase 活性と Exonuclease 活性をブロックすることにより、PCR 反応前の非特異的反応やプライマーの分解を防ぎ、PCR に対する特異性を向上させています。

1. 内容物

KOD-Plus- は容量別に次の 3 種類をご用意しております。

	KOD-201 (200U×1 本)	KOD-201X5	KOD-201X10
KOD -Plus- (1.0 U/μl)	200μl×1 本	(KOD-201)×5	(KOD-201)×10
10× Buffer for KOD -Plus-	1ml×1 本		
25mM $MgSO_4$	1ml×1 本		
2mM dNTPs	1ml×1 本		

2. 安全上の注意

本製品は、研究用試薬です。診断および臨床検査用試薬として使用しないでください。また、本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。関係する実験において、人体に有害な試薬を扱う場合も予想されます。各試薬に添付されている注意書き、機器・器具に添付されている取扱説明書の指示を遵守し、必要に応じて適切な保護具をご使用いただきますようお願いいたします。

3. 性能・品質

（1）KOD -Plus- の標準使用量は、PCR 反応液 50μl あたり、1μl(1U)です。
弊社の検討では、KOD -Plus- 1U の使用で、次のターゲットが増幅できることを確認しています。

λDNA	21kb
Genomic DNA	12kb
逆転写反応液	7kb

（2）KOD -Plus- は、各ロットにおいて、次のターゲット増幅を確認して出荷しております。

Human β-globin	3.6kb
Human p53	4.0kb

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

A３６１６K

4. PCR プロトコール

(1) PCR 反応液の調製

反応液を調製する前に各試薬を十分攪拌してからご使用ください。凍結している試薬は完全に融解してください。(10× PCR Buffer for KOD -Plus-については、融解時に Buffer 中の塩の析出が見られる場合があります。その場合、析出物をボルテックスなどで完全に溶解してからご使用ください。)

Components	Volume	Final Concentration
10× PCR Buffer for KOD -Plus-	5 μl	1×
2mM dNTPs	5 μl	0.2mM each
25mM $MgSO_4$	2 μl	1.0mM
プライマー(10 μM each)	1.5 μl	0.3 μM each
テンプレート DNA	≧ 1 μl	Genomic DNA 10~200 ng/50 μl Plasmid DNA 1~50 ng/50 μl cDNA 5．－（7）の項参照
KOD -Plus- (1U/μl)	1 μl	1 U/50 μl
Autoclaved,distilled water	to 50 μl	

全ての液を添加した後、反応液をボルテックスなどで十分攪拌してからサーマルサイクラーにセットしてください。

(2) PCR サイクル条件

通常は以下の 3 ステップのサイクルを行ってください。Tm の高い(72℃以上)プライマーを用いた PCR で、エキストラバンドが認められた場合は、2 ステップのサイクルをお試しください。

3ステップ			2ステップ		
Pre Denature :	94℃, 2min.		Pre Denature :	94℃,2min.	
Denature :	94℃, 15sec.		Denature :	94℃,15sec.	25～35 cycles
Annealing :	(Tm-5)℃, 30sec.	25～35 cycles	Extension :	68℃,1min. /kb	
Extension :	68℃, 1min. /kb				

伸長時間(Extension)は、ターゲット鎖長1kb あたり 1min.で設定します。

5. 実験をうまく行うために

(1) 反応チューブはできるだけ thin-wall タイプのものをご使用ください。

(2) 滅菌水、プライマーは事前に小分け分注を行って保存し、都度使い切りにすることをお薦めいたします。

(3) dNTPs は必ず本製品添付のもの、あるいは弊社別売の「dNTPs Mixture(2mM)」(Code No.NTP-201)をご使用ください。

(4) プライマーは GC 含量に偏りのない 22~34mer 程度(Tm 値>60℃)のものをご使用ください。また、分子内二次構造や、プライマーダイマーの形成が起こらないように注意して設計してください。

(5) 長鎖ターゲットを増幅する PCR では、Tm 値が 65℃以上のプライマーをご使用ください。

(6) テンプレート DNA の長さや純度は PCR の結果に大きく影響します。テンプレート DNA の量に余裕のある場合は、事前に電気泳動して品質を確認することをお薦めします。本酵素の場合、DNA サンプル中に RNA が多く混入する場合に、PCR 反応が阻害を受ける場合があります。

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

(7) 逆転写反応液をテンプレート DNA として用いる場合、逆転写反応液中の過剰の RNA が PCR 反応を阻害することがあります。PCR 反応液 50μl に添加する逆転写反応液量は、RNA 量として 100ng 以下にすることをお薦めします。つまり、Total RNA1μg を用いて 20μl の容量で逆転写反応を行った場合、PCR 反応への添加量は 2μl 以下になります。また、植物ゲノム DNA など、抽出方法によっては、多量の RNA が混入する可能性があります。RNA の混入を抑えるために、DNA サンプルの液量を少なくすることや DNA サンプルを RNase 処理することをお薦めいたします。

(8) GC rich ターゲットでは、DMSO を終濃度 2~5%になるよう添加すると、増幅が改善される場合があります。

(9) PCR のサイクル数は、テンプレート DNA の量に依存します。通常、ヒトゲノム DNA 50~200ng を用いた場合には 30~40 サイクルで良好な結果が得られます。

(10) Colony Direct PCR を行う場合には、PCR 反応液への菌体の持込を少なくするように注意ください。菌体が肉眼で見えない程度で十分 PCR が可能です。

(11) 本製品で増幅した PCR 産物の末端形状は、blunt end(平滑末端)になっています。PCR 産物をクローニングする場合には、blunt end を利用したクローニングを行ってください。また、弊社 KOD/KOD-Plus-用 TA クローニングキット TArget Clone™ -Plus-(関連商品 参照)を用いることにより、簡便に TA クローニングができます。

6. トラブルシューティング

問題	対策	具体例･目安
増幅産物が見られない	$MgSO_4$ 濃度を上げる。	標準 1.0mM を 1.2mM に上げる。プラスミドの場合は 1.5~2.0mM に上げる。
	アニーリング温度を下げる。	Tm-10℃下げる。
	サイクル数を増やす。	+2~5 サイクル増やす。
	使用しているテンプレート DNA,プライマーの品質を確認する。	テンプレート DNA に RNA 等がコンタミしてないか確認する。
	サンプル中に大量の RNA 成分が混在している。	サンプルを希釈して使用する。
		RNA を分解もしくは除去する。
非特異的増幅産物が見られる	アニーリング温度を上げる。	68℃以上に上げてはならない。
	ステップダウン PCR を行う。	
	$MgSO_4$ 濃度を下げる。	標準 1.0mM を 0.8mM に下げる。
	新しいプライマーセットを設計する。	
バックグラウンドにスメア、エキストラバンドが見られる	サイクル数を減らす。	2~5 サイクル程度減らす。
	テンプレート DNA の量を減らす。	
	$MgSO_4$ 濃度を下げる。	標準 1.0mM を 0.8mM に下げる。
	使用酵素量を下げる。	標準 1U を 0.5~0.8U に下げる。
TA クローニングできない	専用のキットを用いる。	TArget Clone™ -Plus-を用いる。
10× Buffer for KOD -Plus- を解凍した際に沈殿が生じる	析出物を溶解する。	ボルテックスなどで析出物を完全に溶解する。

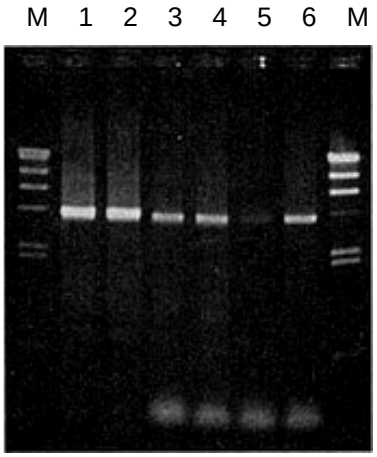
＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

7. 実施例

【実施例 1】

他社高正確性型 DNA Polymerase との比較例

p53 遺伝子の 4kb をターゲットとした PCR において、他社 PCR 用高正確性型 DNA Polymerase と比較を行った。なお、ヒトゲノム DNA は 50 または 100ng 用いた。
その結果、他社酵素ではプライマーダイマーの形成が見られ、充分な増幅産物が得られていないが、KOD -Plus-ではプライマーダイマーの形成が完全に抑えられ良好な結果を得ることができた。



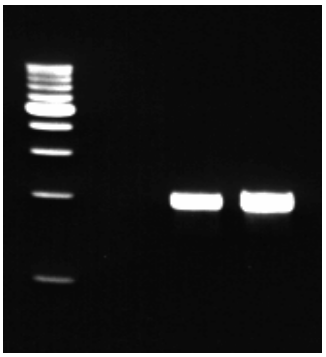
M: λ/*Hin*dⅢ Marker
1: KOD -Plus-,鋳型 DNA 50ng
2: KOD -Plus-,鋳型 DNA 100ng
3: A 社改良型高正確性型酵素,鋳型 DNA 50ng
4: A 社改良型高正確性型酵素,鋳型 DNA 100ng
5: B 社改良型高正確性型酵素,鋳型 DNA 50ng
6: B 社改良型高正確性型酵素,鋳型 DNA 100ng

【実施例 2】

TGF-β 遺伝子(GC:約 70%)の増幅に及ぼす DMSO の効果

通常の条件では増幅が困難であったヒトゲノム DNA を鋳型とした TGF-β 遺伝子(GC:約 70%)約 2kb の増幅条件に関して検討を実施した。通常の 30 サイクルの PCR では全く増幅されず、DMSO を添加することにより、増幅効率が格段に向上した。

(注)
なお、DMSO の添加による KOD DNA Polymerase の正確性の低下はないことが確認されています。



M: 1kb ラダー
1: KOD -Plus-
2: KOD -Plus- + 2%DMSO
3: KOD -Plus- + 5%DMSO

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

当社のライフサイエンス事業部のウェブページ(http://www.toyobo.co.jp/bio/)でも次の実施例をご覧いただけます。

（１） 増幅困難な鋳型による PCR 例
（２） KOD -Plus-を用いた Site-Directed Mutagenesis 法
（３） KOD -Plus-を用いた Long PCR 例
（４） ヘパリン含有サンプルを用いた PCR 例
（５） Colony Direct-PCR による黄色ブドウ球菌の遺伝子プロフィール解析
（６） Colony Direct-PCR による各種微生物遺伝子の簡便･迅速検出

当社では本製品の実施例集を作成しています。ご希望の際には、当社または代理店までご請求ください。
また、KOD -Plus- を用いる際のコツを、「私にもできた! ライフサイエンス実験シリーズ」としてまとめています。
弊社ウェブページ「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

8. 関連商品

品名	包装	Code.No.
<M-MLV 改変型逆転写酵素> ReverTra Ace® (100 U/μl)	10,000 U×1 本 (10,000 U×1 本)×5 (10,000 U×1 本)×10	TRT-101 TRT-101X5 TRT-101X10
<高正確性 PCR 酵素> KOD DNA Polymerase	250 U×1 本 (250 U×1 本)×5	KOD-101 KOD-101X5
<信頼性を向上させた高正確性 PCR 酵素> KOD -Plus-Ver.2	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5	KOD-211 KOD-211X5
<高正確・高効率・高速 PCR 酵素> KOD -Plus-Neo	200 U×1 本 (200 U×1 本)×5 (200 U×1 本)×10	KOD-401 KOD-401X5 KOD-401X10
< KOD/KOD -Plus-用高効率 TA クローニングキット> TArget Clone™ -Plus-	10 回用	TAK-201
dNTPs Mixture(2mM)	1 ml	NTP-201
KOD -Plus-用 Buffer	1 ml	KOD-2B
KOD -Plus-用 $MgSO_4$	1 ml	KOD-2S
KOD -Plus- Ver.2 用 Buffer	1 ml	KOD-3B
KOD -Plus- Neo 用 Buffer	1 ml	KOD-4B

9. 参考文献

(1)Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4504-4510 (1997)
(2)Hashimoto, H., Matsumoto, T., Nishioka, M., Yuasa, T., Takeuchi, S., Inoue, T., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., and Kai, Y., *J. Biochem.* (Tokyo), **125**, 983-986 (1999)
(3)Mizuguchi, H., Nakatsuji, M., Fujiwara, S., Takagi, M., and Imanaka, T., *J. Biochem.* (Tokyo), **126**, 762-768 (1999)

＜製品の内容・技術に関するお問合せ＞
東洋紡（株）ライフサイエンス事業部　テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)
E-mail: tech_osaka@toyobo.jp
[URL] http://www.toyobo.co.jp/bio

【製造･販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(東京)
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号 東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp